

令和元年6月27日現在

機関番号：31602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19691

研究課題名(和文) X染色体不活性化を中心とした妊娠期環境の後天的影響と防御策の実験的検証

研究課題名(英文) Postnatal effect of maternal environment from the perspective of X-chromosome inactivation.

研究代表者

熊本 隆之 (KUMAMOTO, Takayuki)

奥羽大学・薬学部・講師

研究者番号：00433558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Xist遺伝子は胎生期に生じるX染色体不活性化を通じ、脳、生殖、代謝、免疫といった疾病リスクに関わる多数の遺伝子の制御効果を有し、胎生期環境の出生後影響への関与が疑われる。その機序的関連性から、本研究では胎仔期にビスフェノールAと葉酸の単独もしくは併用投与を行い、BPA単独投与で脳、精巣でXistとともに各機能に關与する複数のX連鎖遺伝子群が減少し、加えて葉酸併用により低減防止を示し、毒性防御を部分的に認めた。一方、肝臓では併用による毒性増強効果が見られ、新たな課題が提示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉酸による疾病リスク軽減に対し、新たにXistを起点としたX連鎖遺伝子の変動の観点から説明を加えられた。X染色体を中心とした理論は過去の成果の蓄積と一致し、マーカーとしての利用可能性の探求が進展した。一方、妊娠期葉酸摂取による毒性増強効果を新たに認め、より安全な利用に向けた課題が提示された。

研究成果の概要(英文)：In female mammals one of the two X chromosomes is inactivated in the embryonic stage. The X chromosome has more than 1,000 genes including postnatal disease risk factors concerning development of brain, reproduction, metabolism and immunity. In this study, we administered bisphenol A (BPA) to pregnant mice and analyzed its postnatal effects. Furthermore, we investigated the protective effect of the folic acid against BPA from the perspective of X chromosome inactivation. In result, we investigated that X-linked genes with Xist are decreased in cerebrum and testis in fetal BPA exposure, and it was avoided by administering folic acid. In testis, injury to sperm was partially protected by folic acid. However, the toxicity of BPA was increased in liver and further study is needed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：X染色体不活性化 Xist 胎児期 DOHaD ビスフェノールA 葉酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

X染色体不活性化は発生の初期段階で、女性(XX)の片方のX染色体を不活性化することで男性(XY)のそれと同一にする生体現象である。不活性化はX染色体不活性化因子であるXist遺伝子(X chromosome inactivation factor)が単独で進め、X染色体上の遺伝子(X連鎖遺伝子)のDNAメチル化、ヒストン修飾などエピゲノム変化を通じて不活化を完了させ、その転写を抑制する。TsixはXistのアンチセンス(反対の作用をする相補遺伝子)であり、過剰な不活性化から保護する。不活化完了後もXistがDNAメチル化を継続することで不活化状態を維持する。

ビスフェノールA(Bisphenol A: BPA、2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル))は、電気機器等に用いられるポリカーボネート樹脂、金属の防蝕塗装等に使用されるエポキシ樹脂の原料として用いられる化学物質であるが、内分泌かく乱性が疑われ、生殖器官(雄性生殖機能)への影響が指摘されるとともに、発達・神経毒性、糖尿病など代謝系、免疫系など広範な影響が生じる可能性が指摘されている。その機序要因として、DNA低メチル化等のエピジェネティック修飾に影響を及ぼすことが多く報告されてきている。葉酸は一般に赤血球の成熟やプリン体およびピリミジンの合成に関与し、欠乏症は巨赤芽球性貧血を引き起こすことが知られている。また、母体に葉酸欠乏症があると胎児の神経管閉鎖障害や無脳症を引き起こすことが知られており、妊婦は通常の適正な食事摂取に加えて、日本人の食事摂取基準では付加量が設定されている。通常食のみからの摂取は不十分なケースが多く、日本先天異常学会などでは葉酸サプリメントの摂取を推奨している。また主に海外の研究であるが、母親の葉酸サプリメントの使用は子の自閉症や発達遅滞の発症リスク低下や重症度軽減に関与することが報告されてきている(Suren, *JAMA*, 2014 他)。葉酸は以前よりOne Carbon Metabolismと呼ばれる代謝経路を経て、DNAがメチル化修飾される際のメチル基供与体として機能することが知られており、エピゲノム制御機構へ作用するものとして重要視されている。

妊娠期の葉酸摂取はDOHaD(Developmental Origins of Health and Disease: 成人病胎児期発症仮説、Barker仮説)と密接である。DOHaDは生活習慣病や精神神経疾患等の多因子疾患について、「妊娠期の環境に素因が形成され」「エピゲノム変化とその後の生活環境を介して」発症に至ることとし、妊娠中の介入によりその発症を抑制する「先制医療」の概念が提唱されている。

2. 研究の目的

X染色体不活性化はXistというわずかに1遺伝子が1000種類以上存在するX連鎖遺伝子の発現を制御すること、またX連鎖遺伝子は「中枢神経」「生殖」「免疫」機能、生活習慣病をはじめとする「代謝機能」に深く関わる遺伝子を集中的に要すること、またX染色体不活性化は必ずしも完全ではなく、部分的に免れ、そのパターンが個々によって大きく異なるなど変化を受ける可能性が示されている(Ross et al., *Nature*, 2005, review)。男性(XY)はX染色体不活性化を生じないが、Xistは存在、X染色体に替えが無く影響はより重篤になると推察される。我々はこれらの事象を毒性機序の一要因となりうるか検討を深め、胎仔期BPA投与がXist遺伝子に影響を与え、同時に脳の発達に不可欠なX連鎖遺伝子群を同時かつ広範に変動させることを見出し、報告してきた(Kumamoto et al., *JToxSci*, 2013)。X染色体不活性化は妊娠期にエピゲノム変化によるものであるが、将来の疾患に関わる素因を考え、DOHaD仮説との近接性を考えた。そこで本研究では、妊娠マウスにBPA投与を実施、以前の研究で見出した中枢神経系に加え、雄性生殖系、免疫系、代謝系に対する影響とXist、Tsix、関連するX連鎖遺伝子の関連性を検討し、さらに葉酸投与による予防効果を検討した。

3. 研究の方法

妊娠2日齢のICR系マウスを購入し、ビスフェノールA(BPA)単独投与群、葉酸単独投与群、BPA投与・葉酸併用群の計4群に分け、それぞれ飼育した。到着後1日順化させた後、BPA投与群は出生まで毎日、50mg/kg(body weight)/dayの胃内強制経口投与を行った。BPAは標準品を購入し、コーンオイルに溶解し用いた。Control、葉酸単独投与群は各個体の体重に応じてコーンオイルのみを胃内強制経口投与を行った。葉酸単独投与群、BPA葉酸併用群はAIN93G基礎精製飼料(葉酸濃度: 2mg/kg(diet))を元に作成した葉酸添加食(8mg/kg(diet))を自由摂取とした。妊娠期にはControlおよびBPA単独投与群はAIN93G基礎精製飼料を与え、出生後は全群を通常飼料とし飼育した。飼料は毎回計量して与え、妊娠期から実験完了まで摂取量を算出した。

雌性出生仔は5, 12日齢、7週齢に解剖に供し、大脳、肝臓、胸腺を摘出、total RNAを抽出、リアルタイムPCR法により遺伝子発現変動を検討した。検討遺伝子はX染色体不活性化因子(Xist, Tsix)に加え、X連鎖遺伝子群として大脳はFmr1(Fragile X mental retardation 1), Gdi1(Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1), Nlgn3(Neurexins 3), Ophn1(Oligophrenin 1), Pak3(p21-activated kinase 3)を、肝臓はPdha1(Pyruvate dehydrogenase), G6pd(Glucose-6-phosphate dehydrogenase), Otc1(Ornithine carbamoyl transferase)、胸腺はIl2rg(Interleukin-2 receptor gamma chain), Btk1(Bruton's tyrosine kinase), Cd40L(CD40 Ligand)とした。またゲノムメチル化シトシン濃度(5mC)、肝臓中G6PD活性、血清中IL2(Interleukin-2)濃度、血清中グルコース、トリグリセリド、コレステロール濃度を測定した。

雄性出生仔は9, 16週齢時に解剖に供し、心採血により血清を得、精巣、精巣上体、生殖腺を摘出し重量を測定した。精巣上体は尾部より精子懸濁液を作製、精子解析装置Sperm class

analyzer で運動性、速度等を解析した。精巣より X 染色体不活性化因子 (Xist, Tsix) に加え、雄性生殖機能の発達に関連する X 連鎖遺伝子群として Tex13 (Testis expressed 13)、Usp26 (Ubiquitin specific protease 26)、Taf7L (TATA-box binding protein associated factor 7L)、Nxf2 (Nuclear RNA export factor 2)、Fth17 (Ferritin heavy polypeptide-like 17) を解析した。また血清中テストステロン濃度の測定、精巣ゲノム DNA 中の 5mC 濃度測定を行った。

遺伝子発現変動は、いずれも Gapdh 発現比とした。群間差を検討するため、統計処理は Tukey 法による多重比較検定を行った。

4. 研究成果

(1) 基礎データ

摂餌量について、妊娠中 (GD2-7, GD7-14, GD14-19)、出生後～離乳時 (PND0-19)、離乳後 (PND19-) をそれぞれ測定し、有意な差は無かった。妊娠全期間を通じても差は無かった。葉酸は基礎精製飼料 AIN-93G を基本とした添加食 (混餌投与) としており、群間の摂取量に差は無いことが示された。

妊娠期の母体体重は毎日測定し、群間に差が無いことを確認している。また、出生後に母体より血中葉酸濃度を測定しており、葉酸投与群で増加していることを確認している。

本研究の投与量について、BPA は 50mg/kg を設定している。ヒトの推定一日曝露量 (平均曝露量として 0.02 μ g/kg 体重/日、推定最大曝露量として 0.09 μ g/kg 体重/日と推定：環境省「化学物質の環境リスク評価」2004 年) に比較し高い濃度であるが、わが国および米国環境保護庁 (EPA) で生殖発生毒性試験を含めた毒性試験より算出された最小毒性量 (LOAEL) に基づいて設定した。

(2) 雌性出生仔への影響

解剖時重量について、体重、大脳、肝臓、胸腺重量を測定し、臓器重量は体重補正を行った。Control-BPA 単独投与間に 5 日齢肝臓、12 日齢大脳に有意な増加を認めたが、差はわずかであった。

大脳では、遺伝子発現は特に 12 日齢で顕著な差を示し、Control-BPA 単独投与間に Xist の顕著な減少とともに、Fmr1、Gdi1、Ophn1、Nlgn3、Pak3 の顕著な減少を認めた。これら X 連鎖遺伝子群はいずれも脳発達に分子的な役割を有し、精神・神経発達疾患の原因遺伝子として著名なものを選択しており、これまで多くの報告がある BPA 曝露による脳神経系への影響の一機序である可能性が推察された。また、この現象は我々の以前の報告 (Kumamoto et al, *JToxSci*, 2013) の再現がとれている。さらに注目すべき点として、BPA 単独投与-BPA 葉酸併用群間で有意な増加を示し、Control-BPA 葉酸併用群では有意な差を認めなかった。このことは妊娠期の葉酸投与により BPA による影響の回避 (脳発達に不可欠な遺伝子群の低下を X 染色体不活性化の機序から予防) に繋がっており、本研究の目的が実験的に達成された。また、Tsix 遺伝子に変化はなく、これまでの研究の蓄積の変化の方向性と一致していた。その機序を探るため、大脳よりゲノム中 5mC 濃度を測定したが、低濃度であり、差は不明であった。今後、個別の遺伝子の変動を個々に解析する必要がある。Control-葉酸単独投与群ではいずれの結果も差はなかった。

胸腺に関しては、X 染色体不活性化遺伝子、X 連鎖遺伝子ともに差は無かった。また X 連鎖遺伝子が関与する要素として IL2 を解析したが、差は無かった。またフローサイトメトリーによる T 細胞/B 細胞比解析の予備的検討を実施したが、機序から関連性が低いと判断し中止した。

肝臓では、7 週齢の Control-BPA 葉酸併用群間で顕著な差を示した。遺伝子発現について、Xist 遺伝子の減少とともに、X 連鎖遺伝子群の G6pd、Pdha1、Otc1 遺伝子の減少を認めた。加えて、肝臓中 G6PD 活性、血清中グルコース量 (血糖値)・コレステロール量・脂質量 (トリグリセリド濃度) の測定を行い、Control-BPA 葉酸併用群間で血糖値上昇とコレステロールの減少を認めた。G6PD 活性そのものへの影響はなかった。一般に、摂取されたグルコースはグルコース 6 リン酸、6-ホスホグルコン酸、ピルビン酸、アセチル CoA を経てクエン酸に変換され TCA 回路により ATP を産生し、G6pd (グルコース 6 リン酸脱水素酵素) はペントースリン酸経路を経たグルコース 6 リン酸から 6-ホスホグルコン酸の代謝、Pdha1 (ピルビン酸脱水素酵素) はピルビン酸からアセチル CoA の代謝を行う。また、アセチル CoA は HMG-CoA、メバロン酸を経てコレステロールに至る。ここで、G6pd、Pdha1 が減少したことからグルコース代謝能が低下し血糖値増加に関わったこと、アセチル CoA の供給が減少したことでコレステロール値の低下に関わったことが推察された。これらの結果は DOHaD 仮説の中心命題であり結果の重要性が高いが、血糖値やコレステロール値を変動させる要因は多数あり、慎重な検討が必要である。また、7 週齢以降の加齢による変化を注視する必要がある。なお、トリグリセリド濃度への影響はなく、Control-BPA 単独投与群間、Control-葉酸単独投与群間では差は無かった。

(3) 雄性出生仔への影響

解剖時重量について、体重、精巣、精巣上体、生殖腺重量を測定し、臓器重量は体重補正を行った。9 週齢に比較して 16 週齢により大きな差を認め、精巣重量が BPA 単独投与で低下傾向、BPA 単独投与-BPA 葉酸併用群間で有意に上昇し、Control-BPA 葉酸併用群間で差は消失していた。精巣上体および 9 週齢の精巣、精巣上体でも有意差はないものの同様の傾向を示した。

解剖後、直ちに精巣上部より精子懸濁液を作成し、位相差顕微鏡下で精子運動率、精子直進運動率の観察を行ったところ、16週齢で共にBPA単独投与で低下したが、BPA葉酸併用群でもBPA単独投与と同程度の低下値を示し、葉酸併用による回復はみられなかった。続いて、精子懸濁液よりSperm class analyzerによる速度・進行性等の運動性や形態の詳細解析を実施し、頭部面積、円運動軌跡、進行方向性、曲線地点移動速度、曲線軌道の曲がり具合といった複数の項目に有意な差を認めた。注目すべき点として、精子振動数がいずれの進行速度を有するものでもBPA単独投与で減少し、BPA葉酸併用投与でControlと同程度に上昇することが見られた。

遺伝子発現変動として、精巣よりX染色体不活性化因子および雄性生殖発達に関わるX連鎖遺伝子群を測定したところ、9週齢ではいずれの遺伝子にも有意な差を認めなかった(Nxf2のControl-葉酸単独投与群間のみ有意に減少)。一方、16週齢ではControl-BPA単独投与群間でXistの減少とともにTex11, Taf7L, Nxf2, Utxの減少を認め、さらに、これら遺伝子発現はいずれも葉酸併用により上昇し、Controlとの差は消失していた。その機序を探るため、精巣ゲノムDNA中の5mC量を解析し、BPA単独投与-葉酸BPA併用群間で有意な増加を示していた。また、精子性状に影響を及ぼす要因として血清中テストステロン濃度を測定し、9週齢では差は無かったものの、16週齢でBPA単独投与で減少、葉酸BPA併用群でやや回復していた。

これらの事象をまとめると、BPA単独投与でXistとともにX連鎖遺伝子群の減少、それとともに精巣・精巣上部重量の低下や精子性状の悪化が見られ、また、葉酸併用によりX連鎖遺伝子群の上昇とともに精巣・精巣上部重量や一部の精子性状(精子振動数)の回復がみられた。一方、BPA単独投与ではテストステロン濃度減少による影響が加わり、また精子運動性の回復が得られなかったことから、Xistとそれに追従するX連鎖遺伝子群の精巣毒性の関与は単独で決定付けるものではないが、一要因として考慮すべきことであると示唆された。5mCの変化は葉酸添加による方向性と一致し、BPA葉酸併用群の増加は転写抑制方向に働くことも一要因と考えられる。

(4)まとめ

以上、脳発達および雄性生殖系で、妊娠期葉酸投与により、BPA投与による影響を回避できる現象を部分的に見出すことができた。その分子機序としてXistが関与している可能性が高く、葉酸併用による変動の機序をより詳細に検討する必要がある。時期特異性、臓器特異性に関しても深める必要がある。また、肝臓でBPA単独では見られない影響が葉酸投与を行うことで顕在化する興味深い現象を発見したが、これまで報告がなく、考察を深める必要がある。本研究は交付後に他の公的研究に参画することとなりやや遅れが生じたが、新たな知見が生じ、今後、関連学会への発表や雑誌論文報告等を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

熊本隆之、押尾茂、X染色体不活性化を中心とした胎生期環境の成長後影響、日本衛生学雑誌、査読有、73(2)、2018、101-104、DOI:10.1265/jjh.73.101

熊本隆之、X染色体不活性化を中心とした胎生期化学物質曝露の影響、環境ホルモン学会ニュースレター、査読有、20(1)、2017

熊本隆之、X染色体を中心とした新たな化学物質毒性メカニズムの体系化と影響評価システムの構築、バイオクリニカ、査読有、31(5)、2016、62-64

〔学会発表〕(計6件)

熊本隆之、NGS Based Technologies Enable Biomarker Development and Discovery in Toxicology、第19回日本毒性学会、2018

熊本隆之、X染色体不活性化を中心とした胎生期化学物質曝露の影響、第19回環境ホルモン学会若手シンポジウム、2016

熊本隆之、押尾茂、X染色体と男性不妊・精子形成、第24回精子形成・精巣毒性研究会、2016

熊本隆之、押尾茂、X染色体不活性化を中心とした新たな毒性発現機序・バイオマーカーの可能性、第43回日本毒性学会学術年会シンポジウム「次世代研究セミナー：新規アプローチによる毒性発現機序解明とバイオマーカー探索」、2016

熊本隆之、押尾茂、妊娠期低葉酸飼育が次世代雄性生殖機能に及ぼす影響、第35回日本アンドロロジー学会、2016

熊本隆之、押尾茂、マウス胎生期低葉酸飼育の出生後影響：X染色体不活性化を中心とした解析、第86回日本衛生学会シンポジウム「出生前から生涯にわたる健康を守るための概念DOHaDの実証研究 up-to-date」、2016

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。